



TITLE:

NPC1L1を介したコレステロール吸収を阻害する新規化合物の同定(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

千場, 智尋

CITATION:

千場, 智尋. NPC1L1を介したコレステロール吸収を阻害する新規化合物の同定. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-05-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19191>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016-04-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	千場 智尋
論文題目	NPC1L1を介したコレステロール吸収を阻害する新規化合物の同定		
(論文内容の要旨)			
<p>高コレステロール血症は、我が国において死因の上位を占める心筋梗塞や脳梗塞を誘発する動脈硬化症の危険因子であり、血中コレステロール濃度の適切な調節がこれら疾患の予防として重要である。近年、食事および胆汁由来コレステロールの小腸からの吸収を阻害するezetimibeが、高コレステロール血症改善に有効であること、またその標的蛋白質が小腸管腔膜に局在するNiemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1)であることが報告された。高コレステロール血症改善の第一選択薬は、肝臓におけるコレステロール生合成遮断薬のスタチン系薬剤であるが、スタチン系薬剤の単独療法で目標値の血中コレステロール濃度に到達できない患者に対してはezetimibeとの併用療法が有効であることが報告され、ezetimibeの作用機作に注目が集まっている。一方、NPC1L1遺伝子には多型性が存在し、ezetimibeの効果には個人差が多いことも指摘されている。そこで本研究では、多様な構造の化合物群を含有する植物やキノコ類の抽出物から、NPC1L1に結合し、ezetimibeと同様にNPC1L1依存的なコレステロール取込みを阻害する天然化合物を探索することを目的とした。本論文の主な内容は以下の通りである。</p> <p>第一章では、NPC1L1とezetimibeの結合を阻害する植物やキノコ類の抽出物を探索し、活性化合物の単離および構造決定を試みた。NPC1L1は13個の膜貫通αヘリックス (TM) から成る膜蛋白質であり、TM2とTM3の間に位置する第二細胞外ループは、ezetimibe結合部位として知られている。Ezetimibeの代謝産物を放射性標識した³H]ezetimibe-glucuronide (³H]EZG) とNPC1L1発現細胞の膜画分との結合を指標に、約2000種類の植物やキノコ抽出物によるその結合阻害活性を評価したところ、キノコ的一种であるクロサルノコシカケ (<i>Fomitopsis nigra</i>) に強い阻害活性を見出した。クロサルノコシカケ抽出物は、高コレステロール食摂取ラットに対して血中コレステロール低下作用を示し、さらにこの抽出物をヘキサン層、中間層、アセトニトリル層に分配した画分のうち、アセトニトリル層のみに血中コレステロール低下作用が認められた。そこで、アセトニトリル層を出発材料として、各種カラムによる分画と³H]EZG結合阻害実験による活性評価を行い、活性化合物の単離を試みた。その結果、無色オイル状の活性化合物を得ることに成功した。高分解能液体クロマトグラフ質量分析計による精密質量数から組成式を推定し、¹Hおよび¹³C NMR、赤外線分光スペクトル等、機器分析による構造解析を行った結果、得られた活性化合物はラノステロン誘導体の一種であり、新規化合物の15,21-dihydroxylanosta-8,24-dien-3-oneであると決定し、fomiroid Aと命名した。Fomiroid Aはステロール骨格を有しているため、NPC1L1のコレステロール結合部位であるN末端ドメインへの結合を介して³H]EZG結合を阻害すると推測した。しかし、同様にステロール骨格を有し、N末端ドメインに結合するラノステロールや25-ヒドロキシコレステロールには、³H]EZG</p>			

結合阻害活性は認められなかった。これらの結果から化合物結合によって引き起こされるNPC1L1のN末端ドメインの構造変化は、ezetimibe結合に影響しないことが推測され、fomiroid A結合部位はN末端ドメインとは異なることが示唆された。

第二章では、fomiroid AがNPC1L1に直接結合することを明らかにするため、NPC1L1変異体（L1072T/L1168I）を用いたファーマコロジカル・シャペロン活性を検証した。また、NPC1L1機能に与えるfomiroid Aの影響を明らかにするため、NPC1L1依存的なコレステロール取込みに対する阻害活性を調べた。L1072T/L1168I変異体は、変異による立体構造の変化から主に小胞体に局在するが、fomiroid Aを処理することによって細胞膜に再分布することが、共焦点レーザー顕微鏡を用いた局在解析により観察された。また、ウェスタンブロッティングによる解析では、複合型糖鎖修飾された成熟型NPC1L1のバンド強度がfomiroid A処理により増強することがわかった。さらに、フローサイトメトリーを用いた解析から、fomiroid A処理によりL1072T/L1168I変異体を細胞膜に発現する細胞数が1%から25%に増加することが示され、L1072T/L1168I変異体に対してfomiroid Aがファーマコロジカル・シャペロン作用をもつことが明らかとなった。一方、第二細胞外ループに結合するezetimibeは、L1072T/L1168I変異体に対してファーマコロジカル・シャペロン作用を示さなかった。これらの結果から、小胞体に留まるL1072T/L1168I変異体に対して、fomiroid Aはezetimibe結合部位とは異なる部位に直接結合し、その立体構造の異常を補正することが示唆された。続いて、NPC1L1機能に及ぼすfomiroid Aの影響を明らかにするため、 $[^3\text{H}]$ cholesterolとNPC1L1発現細胞を用いてコレステロール取込みを評価した。その結果、fomiroid AはNPC1L1依存的なコレステロールの細胞内への取込みおよびコレステロールの脂肪酸エステル形成を阻害することが明らかになった。また、その阻害作用はezetimibeと同等であった。

以上のように本研究は、天然物由来の新規化合物がNPC1L1の機能を阻害することを初めて示した研究である。第一章および第二章における結果から、血中コレステロール低下作用を示すクロサルノコシカケ抽出物より単離され、構造決定した新規化合物のfomiroid Aは、NPC1L1のN末端ドメインやezetimibe結合部位とは異なる部位に直接結合することが示唆された。さらに、fomiroid Aがezetimibeと同様、NPC1L1依存的なコレステロールの取込みおよびコレステロールの脂肪酸エステル形成を阻害することを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

コレステロールは細胞膜構成成分として必須であるばかりでなく、ステロイドホルモン、胆汁酸、ビタミン D 合成の前駆体として重要である。しかし、動脈壁における過剰なコレステロールの蓄積は冠動脈性心疾患の原因となるため、血中コレステロール濃度の適切な調節が重要である。コレステロール吸収阻害剤である ezetimibe は、高コレステロール血症改善を目的とした医薬品であり、小腸管腔膜においてコレステロール吸収を担う Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) を標的蛋白質としている。しかし、ezetimibe の効果には個人差があり、ezetimibe とは作用機序の異なる新たな阻害剤の開発が望まれている。本論文は、NPC1L1 の機能を阻害する新規な天然化合物を発見したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. 担子菌類の一種クロサルノコシカケ (*Fomitopsis nigra*) 抽出物は、NPC1L1 に対する ezetimibe の結合を阻害し、血中コレステロール低下作用を有することを明らかにした。
2. この抽出物の中から有効成分を単離・精製し、新規な天然化合物である fomiroid A を発見した。
3. Fomiroid A は、NPC1L1 に直接結合することが示唆され、その結合部位は、コレステロールが結合する N 末端ドメインおよび ezetimibe 結合部位のどちらも異なることが示唆された。
4. Fomiroid A は、ezetimibe と同様、NPC1L1 依存的なコレステロールの細胞内への取込みおよびコレステロールの脂肪酸エステル形成を阻害することを明らかにした。

以上のように、本論文は小腸からのコレステロール吸収の中心的役割を果たす NPC1L1 の機能を、天然物由来の新規化合物が阻害することを初めて示したものであり、天然物化学、生化学、分子生物学、細胞生物学、基礎生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 27 年 3 月 5 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)